

435-200

AU 127

47602

FEB

1976

JA 0015686

FEB 1976

AN

DUP. 1.72

SS. 1.95

RECORDED

① 日本国特許庁

公開特許公報



特 許 願

2,000.



昭和49年7月26日

特許庁長官・斎藤英雄殿

① 特開昭 51-15686

④ 公開日 昭51. (1976) 2.7

② 特願昭 49-85119

② 出願日 昭49. (1974) 7.28

審査請求 有 (全3頁)

庁内整理番号

7235 4P
7048 4P

1 発明の名称

コロン セイキイロウキ
酵素の精製方法

2 発明者

住所 神奈川県伊勢原市沼目906番地13号

氏名 小林 時夫 (ほか1名)

3 特許出願人

住所 東京都中央区日本橋蛸町1丁目8番地

電話番号 東京 279-0371

郵便番号 103

名称 わかもと製薬株式会社

代表者 牧田 敏市



⑤ 日本分類

J6(2)C1
J6(2)C01⑥ Int. Cl²C07G 7/02
C07G 7/028
C12D 13/10

87X/12 804 D16 WAKA 26.07.74
WAKAMOTO PHARM KK *J5 1015-686
26.07.74-JA-085119 (07.02.76) C07g-07/02 C12d-13/10
Purification of lactase enzyme solns. - by adding alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride to ppte. impurities

Alkyldimethylbenzyl ammonium chloride (Cg-18) is added to soln. contg. lactase, which is produced from the strain belonging to *Aspergillus oryzae*, so to result in a concn. of 0.05-0.2% (pH 6.7-7.0), impurities being ppte. Lactase is taken up from the supernatant. The lactase-contg. soln. contains colouring substances difficult to be adsorbed on active carbon and not decolorized by simple pptts. because it behaves together with lactase protein in a pptn test with org. solvent. In this method, impurities such as pigment, etc. are ppte. electively with no influence on lactase activity. Lactase is useful as therapeutic drug to treat intolerance of lactose in infants.

EXAMPLE

Liquid *Aspergillus oryzae* AKU3301 was inoculated to malted rice sterilized with water and incubated at 30°C. for 3 days to give dry malted rice which was extracted with water to give the liquid of lactase activity 80 u/ml, 12 l. The liquid was adjusted with N-NaOH to pH 6 followed by addition of 12 g of benzarconium chloride. The resulting precipitates were subjected to centrifugation and then 3

D5-C3.

1 159

times volume of ethanol was added to pale yellow supernatant at 0°C. After separation of the resulting precipitates, the supernatant was washed with ethanol and dried to give white powder of lactase activity 9200 µg, 77 g (yield 74%).

にアルキルジメチルベンジルアンモニウムクロ
ライドを添加して不純物を沈降させ、その上澄
液からラクターゼを採取することを特徴とする
酵素の精製方法に関するものである。

ラクターゼは乳糖をグルコースとガラクトー

性炭に吸着され難く、しかも有機溶媒沈降でラ
クターゼ蛋白と挙動を共にするため簡単な操作
で脱色することは困難である。

本発明者らはアスペルギルス・オリゼの発
抽出液から製品価値の高い白色の酵素製剤を得

るため種々検討を重ねた結果、アスペルギルス・オリゼの生産するラクターゼを含む液にアルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライドを添加することによりラクターゼ活性に何ら影響することなく、色素等の不純物を選択的に沈殿させ得ることを発見した。 / 字抹

本発明はかかる新知見にもとづいてなされたものであって、アスペルギルス・オリゼの生産するラクターゼを含む液にアルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライドを添加して色素等の不純物を沈殿せしめ、その上澄液から該酵素を採取することを特徴とする酵素の精製法である。

本発明に使用するアルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライドのアルキル基の炭素数は8～18のものが好適であって、一般に塩化ベンザルコニウムの名で市販されている炭素数8～18の混合物も使用し得る。

酵素液に添加するアルキルジメチルベンジルアンモニウムクロライドの量は酵素液中に含ま

なおラクターゼ活性は次の方法で測定した。すなわち0-ニトロフェノール・β-D-ガラクトピラノシッド溶液 (PH4.5) に37℃で酵素を作用せしめ、遊離した0-ニトロフェノールの量を420 mμの吸光値から算出し、37℃1分間に1μ molの0-ニトロフェノールを生成する酵素活性を1単位とした。

次に本発明の具体的な例を実施例で示す。

実施例 1

アスペルギルス・オリゼ AKU 3301の液種を加水滅菌した瓶に接種して30℃で3日間培養後通風乾燥して乾燥菌を得た。この乾燥菌を水で抽出し、ラクターゼ活性80u/mlの抽出液12gを得た。1N-苛性ソーダでPH4.0に調整後塩化ベンザルコニウム12gを添加して着色物質を沈殿せしめ遠沈により沈殿を分離し淡黄色の上澄液を得た。この液に0℃で5倍量のエタノールを加え、遠沈にて沈殿を分離し、冷エタノールで2回沈殿を洗滌後真空乾燥した。

特開 昭51-15686 (2)

れる色素ならびに不純蛋白の濃度によって異なるが、乾燥菌から10倍量の水で酵素を抽出した抽出液の場合には濃度0.05～0.2%になるように添加すればよく、また粗酵素粉末を再溶解した濃厚液でも濃度約0.5%になるように添加すれば充分である。添加時の酵素液のPHは6.0～7.0が好適であり、それ以上のPHではラクターゼが不安定となり好ましくない。

次に本発明の効果を説明するために、アスペルギルス・オリゼ AKU 3301の固体培養液の水抽出液に塩化ベンザルコニウム (局方品) を添加して脱色した場合と無処理の場合とを比較した成績を表1に示す。

表 1

	塩化ベンザルコニウム添加濃度 (%)				
	0	0.015	0.05	0.1	0.15
処理液ラクターゼ活性(u/ml)	60	60	60	59	59
収 率 (%)	100	100	100	98	98
処理液色調 (OD470)	160	112	0.640	0.480	0.320
採取酵素量 (g/g)	7.5	7.4	7.4	7.2	5.3
ラクターゼ活性 (u/g)	6080	6080	6160	6230	8010
酵素剤の色	褐色	褐色	灰白色	白色	白色
溶媒沈殿収率 (%)	76	75	74	73	72

ラクターゼ活性9200u/gの白色粉末77gが得られた。収率74%

実施例 2

実施例1と同様にして得た乾燥菌の水抽出液10gを1N-苛性ソーダでPH4.0に調整後0℃で5倍量のアセトンを加え4時間放置後沈殿を遠沈分離した。得られた僅微沈殿を2倍量の水に溶解し、1N-苛性ソーダでPH4.0に調整後塩化ベンザルコニウム0.5%を添加して着色物質を沈殿せしめた。この上澄液に0℃で3倍量のエタノールを加え、生じた沈殿を分離し、冷エタノールで2回洗滌後真空乾燥した。ラクターゼ活性11000u/gの白色粉末47.7gが得られた。収率70%

特許出願人

わかもと製薬株式会社

4. 添付書類の目録

- (1) 明-細 書 1通
- (2) 願書副本 1通

5. 前記以外の発明者

アッダ シヘヤシ
住所 神奈川県厚木市林910番地
氏名 前田 晃 治